Semnan University of Medical Sciences

KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Volume 20, Issue 3 (Summer 2018), 417-602

ISSN: 1608-7046

Full text of all articles indexed in:
Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase

بررسی فعالیت ژن‌های بیوفیلم *icaA* و *icaR* *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین تیمارشده با ویتامین K در نمونه‌های زخم

نعیمه کاشفی‌پسندیده [۱](M.Sc)، محمدرضا حبیبی [۱](Ph.D)، حامد طهماسبی [۲](M.Sc)، محمدرضا عربستانی [۳و۴*](Ph.D)

۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران

۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران

۳- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۴- مرکز تحقیقات بروسلوز، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۲۳۸۳۸۰۷۷ mohammad.arabestani@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷

چکیده

هدف: استفاده از ویتامین K، در سلامت انسان نقش بسیار مهمی دارد. ممکن است این ویتامین اثراتی بر عمل‌کرد برخی عوامل بیماری‌زایی مانند بیوفیلم در *استافیلوکوک اورئوس* بگذارند. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ژن‌های بیوفیلم *icaA* و *icaR* *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین تیمارشده با ویتامین K در نمونه‌های زخم می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی مداخله‌ای، ۱۵ ایزوله *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین با استفاده از غلظت‌های هفت‌گانه از پودر ویتامین K که به صورت ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، تیمار شدند. بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جهت گرم‌خانه‌گذاری تعیین شد. در نهایت RNA های مورد نظر قبل از بعد از تیمار استخراج و سنتز cDNA صورت گرفت. با استفاده از روش qPCR میزان بیان ژن‌های *icaA* و *icaR* مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: مقادیر بیان ژن‌های *icaA* و *icaR* قبل از تیمار شدن با ویتامین ثبت شدند و به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. دو ژن مورد مطالعه در ایزوله‌های تیمار شده با ویتامین K دارای کاهش میزان بیان بودند. این اثردهی، از غلظت ۲۰۰ میکروگرم به صورت کاملاً محسوس دیده شد. هم‌چنین بیان ژن‌های *icaA* و *icaR* در گرم‌خانه‌گذاری ۴۸ ساعت، بیش‌ترین کاهش را داشت.

نتیجه‌گیری: ویتامین K می‌تواند در کنار برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، جهت درمان برخی از عفونت‌های *پوستی استافیلوکوک اورئوس* دارای مقاومت به متی‌سیلین موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، بیوفیلم، *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین، ویتامین K

مقدمه

استافیلوکوک اورئوس یکی از مهم‌ترین و خطرسازترین باکتری‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی می‌باشد. این باکتری می‌تواند عفونت‌های مختلفی را از جمله، عفونت خون، عفونت زخم، عفونت ادراری، عفونت‌های دستگاه تنفسی و در پاره‌ای از مواقع عفونت‌های چشمی را ایجاد کند [۲،۱]. بعد از ظهور سویه‌های مقاوم به پنی‌سیلین، از آنتی‌بیوتیک جایگزین، یعنی متی‌سیلین برای درمان استفاده شد، اما چندی بعد سویه‌های استافیلوکوک مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) ظهور پیدا کردن و تا اواخر دهه ۷۰ میلادی به اوج خود رسیدند [۳]. اخیراً تحقیقات محققان به سمت ویتامین‌های محلول در چربی و استفاده از آن‌ها علیه از بین بردن برخی عفونت‌های باکتریایی کشیده شده است. سال ۲۰۱۲ که توسط سازمان بهداشت جهانی، سال مقاومت آنتی‌بیوتیکی لقب گرفت، جرقه‌های استفاده از برخی موادی که نه تنها برای بدن ضرر ندارند بلکه در کنار فواید بی‌شمار خود، می‌توانند در برخی فعالیت‌های مهم دیگر نیز دخالت کنند، را ایجاد کرد [۴،۲]. ویتامین K یکی از ویتامین‌های محلول در چربی می‌باشد که با داشتن خصوصیات ساختاری می‌تواند در برخی موارد ایراد کاهشی بر روند تولید و تشکیل بیوفیلم بگذارد [۶،۵]. دو نوع ویتامین Kوجود دارد؛ ویتامین K1 که در گیاهان یافت می‌شود و ویتامین K2 که در بدن انسان و حیوانات ساخته می‌شود [۷]. این ویتامین در سال ۱۹۳۵ میلادی کشف و به عنوان ویتامین انعقاد خون که برای جلوگیری از خونریزی‌های کشنده

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

ضرورت دارد شناخته شد. این ویتامین برای تشکیل پروتومبین، به وسیله کبد، دخالت می‌کند و کمبود آن سبب خونریزی می‌گردد [۸].

بیوفیلم شامل مجموعه‌ای از میکروارگانیزم‌ها می‌باشد که که در سطح و ماتریکس یک جسم غیر زنده و یا یک موجود زنده بهم متصل شده و سبب ایجاد یک سطح ژله‌ای می‌شوند [۹]. از مهم‌ترین ویژگی‌های بیوفیلم می‌توان به کمک به بقاء باکتری در شرایط سخت محیطی، نقش در بیماری‌زایی و ایجاد بیماری‌های کرونیک و مزمن، اثرگذاری آن در ایجاد و تقویت مقاومت دارویی از طریق نفوذناپذیری آنتی‌بیوتیک در ماتریکس پلیمری، تسهیل در انتقال ژن از طریق حضور این لایه توسط گروه خاصی از اوپرون‌های ساختاری به نام اوپرون‌های داخل سلولی یا Intracellular adhesin (ica) کد می‌شود که دارای لوکوس‌های ژنی مختلف شامل *icaA*، *icaD*، icaB و icaD می‌باشد. این لوکوس ژنی ارتباط تنگاتنگی با ادهزین‌های پلی‌ساکاریدی داخل سلولی (PIA) [۱۱،۱۰]. در مطالعاتی در سال ۲۰۱۴ در آمریکا در یک مطالعه مروری اثر عمل‌کردی برخی مواد را بر روی تولید بیوفیلم در باکتری *استافیلوکوک اورئوس* را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی با اثردهی ویتامین K و یکی از شاخه‌های جانبی این ویتامین یعنی Menaquinone بر میزان تولید بیوفیلم، این نتیجه به‌دست آمد که این ویتامین و عوامل وابسته به آن می‌تواند اثر موثری را بر روی باکتری‌هایی که توانایی تولید بیوفیلم دارند، خصوصاً *استافیلوکوک اورئوس*، بگذارد [۱۳،۱۲].

گسترش آلودگی و هم‌چنین تشکیل بیوفیلم در تجهیزات و وسایل پزشکی منجر به افزایش عفونت‌های بیمارستانی شده و تلاش برای حذف این گونه آلودگی‌ها را ضروری ساخته است. تشکیل بیوفیلم، حساسیت به درمان‌های ضد میکروبی را کاهش می‌دهد که نهایتاً هزینه‌های درمانی بالایی برای بیماران به دنبال خواهد داشت [۱۳]. از این‌رو استفاده از برخی ویتامین‌ها مانند ویتامین K در کنار آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر جهت درمان عفونت‌های پوستی، ممکن است اثرات موثری بر محدود کردن عوامل بیماری‌زا، از جمله بیوفیلم باکتری داشته باشد، لذا هدف از این مطالعه تعیین میزان بیان ژن‌های icaA و icaR در ایزوله‌های جدا شده از نمونه‌های زخم تعیین شد.

مواد و روش‌ها

کشت اولیه ایزوله‌های مورد مطالعه. در این مطالعه مداخله‌ای، از ۱۵ ایزوله *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین ذخیره شده در بانک میکروبی گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان استفاده شد. معیار ورود در این مطالعه مثبت بودن تولید بیوفیلم توسط *استافیلوکوک‌های اورئوس* تعیین شد و معیار خروج هم عدم توانایی تولید بیوفیلم بود. در ابتدا همه ایزوله‌ها برای انجام کارهای اولیه بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شد و جهت حذف هر گونه آلودگی احتمالی، مجدد از تست‌های بیوشیمایی کواگولاز، مانیتول، DNAas و کاتالاز جهت تایید سویه‌های مورد مطالعه استفاده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA از ایزوله‌های تیمارنشده. RNA سلولی با استفاده از متد وابسته به کیت ReboEX (GeneAll، کره) صورت پذیرفت. به این منظور ایزوله‌های کشت داده شده روی محیط مولرهینتون آگار به‌صورت تلقیح سنگین (چندکلنی به‌صورت هم‌زمان یا معادل ۴ برابر نیم مک فارلند) به یک میلی‌لیتر از محلول RNX (سیگما) اضافه شده و پس از مخلوط نمودن، به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس ۲۰۰ µl کلروفرم به آن اضافه نموده و پس از مخلوط نمودن، به مدت ۵ دقیقه در دمایی ۴ درجه قرار گرفت. سپس سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ RPM و دمای ۴ درجه انجام گرفت. هم‌چنین جهت سنتز cDNA نیز از کیت سنتز Hyperscript (GeneAll کره) استفاده گردید. در نهایت کیفیت و کمیت محصولات به‌دست آمده با روش ژل الکتروفورز ۲/۵ درصد و خوانش جذب نوری در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند [۱۴].

تیمار ایزوله‌های مورد مطالعه با غلظت‌های مختلف ویتامین K. جهت تلقیح ویتامین K در ابتدا غلظت‌های هفت‌گانه به‌صورت ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. غلظت‌های ویتامین K بر مبنای استاندارد CLSI جهت تعیین حداقل غلظت مهاری تعیین شده بود، تهیه گردید. بدین صورت که پودر ویتامین بعد از رقیق‌سازی با محلول DMSO بر اساس میزان غلظت و خلوص درج شده بر روی ویال پودر ویتامین در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق‌سازی شد. برای سنجیدن میزان و مقدار اثر ویتامین K بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری (انکوباتور شیکردار) تعریف گردید. در فواصل زمانی تعریف شده جذب نوری از محلول‌های مخلوط ویتامین و باکتری گرفته شد. جذب نوری بیش‌تر از ۰/۱ نانومتر به عنوان رشد در نظر گرفته شد. بعد از مشخص کردن مرحله رشد و میزان رشد کلنی‌های تلقیح شده با استفاده از جذب نوری و لگاریتم رشد، فاز رشد تعیین شد. در نهایت بعد از هر بازه زمانی و خوانش جذب نوری، مقداری از محلول جهت استخراج RNA و سنتز cDNA ذخیره‌سازی شد. در همه

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

تست‌ها، از غلظت نیم مک فارلند باکتری فاقد ویتامین به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد [۱۵].

استخراج RNA و سنتز cDNA از ایزوله‌های تیمار شده

ایزوله‌های تیمارشده در هر بازه زمانی و هر غلظت، جهت انجام مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA طبق دستورالعمل ذکر شده در قسمت قبل، صورت پذیرفت.

تعیین میزان بیان ژن‌های *icaA* و *icaR* قبل و بعد از تیمار با ویتامین K. جهت بررسی Efficiency و شرایط حاکم بر واکنش، نمودار استاندارد رسم گردید. برای این کار رقت‌های مختلف از محصول PCR حاصل را تهیه کرده و سپس برای آن‌ها تست PCR time-Real انجام و از CTهای حاصل و غلظت موجود جهت ترسیم نمودار استاندارد استفاده شد، بعد از تهیه نمودار استاندارد به وسیله فرمول $Efficiency= 10^{(-1/slope)} - 1$ بازدهی واکنش PCR time-Real ارزیابی گردید. محاسبه بیان ژن‌ها بر اساس فرمول $1+Efficiency^{(-\Delta CT)}$ و مطالعات Pfaffl method انجام پذیرفت که در این بررسی یک ژن رفرانس و یک یا چند ژن هدف وجود دارد [۱۶]. هم‌چنین به منظور انجام واکنش Real-Time PCR از دستگاه Applied Biosystem (ABI آمریکا) و مستر میکس حاوی شناساگر EvaGreen (solis.biodyne فنلاند) استفاده شد. در ابتدا جهت مشخص کردن میزان بیان ایزوله‌های تیمارنشده، مراحل آزمون Real Time PCR برای نمونه‌های مورد مطالعه طراحی شد. میکس آماده شده شامل ۴ میکرولیتر مستر میکس، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱) ۱میکرولیتر cDNA و باقی‌مانده حجم نیز با مایع DEPS تا ۲۰ میکرولیتر جبران شد. شرایط دمایی برای هر دو ژن نیز به‌صورت واسرشت‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ دقیقه، و ۴۰ سیکل شامل واسرشت‌سازی ثانویه ۱۵ ثانیه، اتصال ۵۸ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه و مرحله طویل‌سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه تعریف گردید. مراحل فوق جهت انجام آزمون Real Time PCR به منظور به‌دست آوردن میزان بیان ژن های *icaA* و *icaR* در نمونه‌های تیمار شده نیز منظور گردید.

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در Real-Time PCR

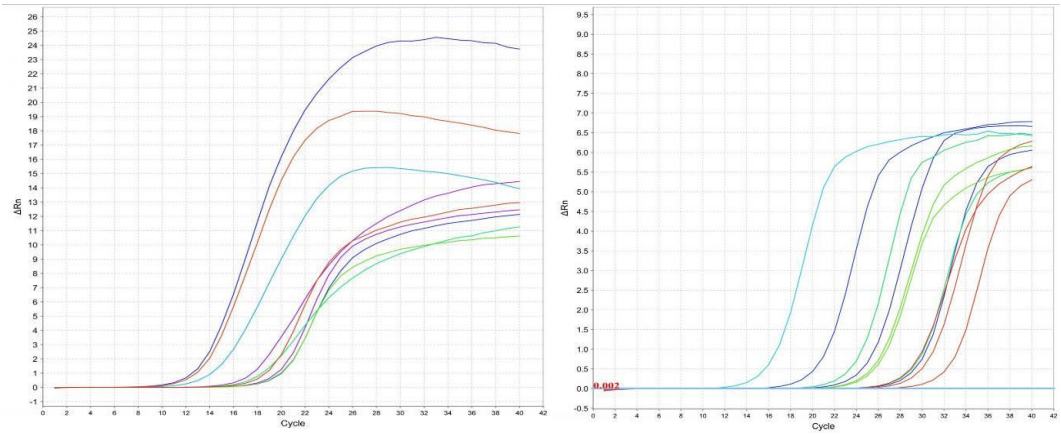
ژن ها	Reverse primer	طول قطعه (bp)
gmk	ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA	۳۱۸
icaA	ACA GTC GCT ACG AAA AGA AA GGA AAT GCC ATA ATG ACA AC	۱۰۳
icaR	TAA TCC CGA ATT TTT GTG AA AAC GCA ATA ACC TTA TTT TCC	۴۴۶

تجزیه و تحلیل آماری. به منظور آنالیز کمی اطلاعات از نرم‌افزار REST نسخه ۲۰۰۸ استفاده گردید. از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری Two Way ANOVA و t-Student جهت آنالیز آماری متغیرهای مختلف استفاده گردید (P≤۰/۰۱، P≤۰/۰۵).

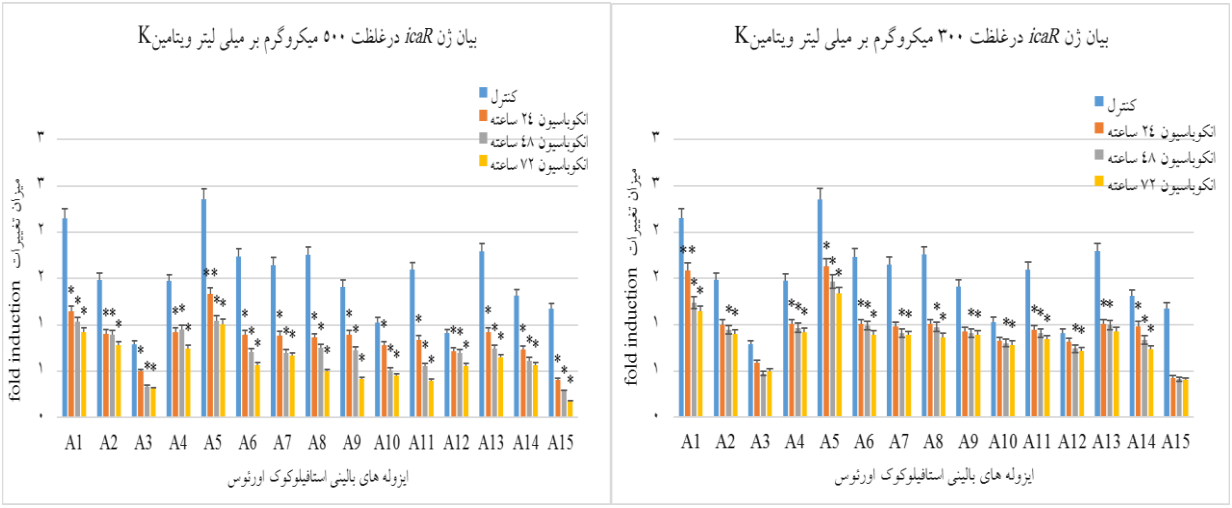
نتایج

بیان ژن icaR در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تغییر چندانی را نشان نداد. در حالی که، از غلظت‌های ۲۰۰ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تغییرات محسوسی در کاهش میزان بیان ژن *icaR* مشاهده شد. این در حالی بود که، غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیش‌ترین اثر بر کاهش بیان ژن *icaR* داشت. علاوه بر این آنالیز آماری متغیرهای مورد بررسی در ایزوله‌های تیمار شده و تیمار نشده نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین زمان انکوباسیون، غلظت ویتامین و کاهش بیان ژن *icaR* مشاهد شد. به نحوی که، با افزایش مدت انکوباسیون و بالابردن غلظت ویتامین مورد بررسی، بیان ژن نیز با کاهش بیش‌تری مواجه شد (شکل ۱و ۲). بیان ژن *icaA* نیز در ایزوله‌های تیمار شده با ویتامین K در غلظت‌های مختلف دارای کاهش بیان بود. غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بهترین اثر بر کاهش بیان ژن *icaA* داشت و سایر غلظت‌های تهیه شده اثر چندانی بر ایزوله‌های مورد مطالعه نداشتند. ایزوله‌های A8، A9 و A11 که فعالیت بیش‌تری از نظر بیان ژن مورد مطالعه داشتند، با بیش‌ترین کاهش بیان مواجه شدند. آنالیز آماری نتایج حاصل از بیان ژن *icaA* نشان داد در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ارتباط معنی‌داری بین زمان انکوباسیون، غلظت ویتامین تلقیح شده و مقدار کاهش بیان ژن وجود داشت (شکل ۱ و ۳).

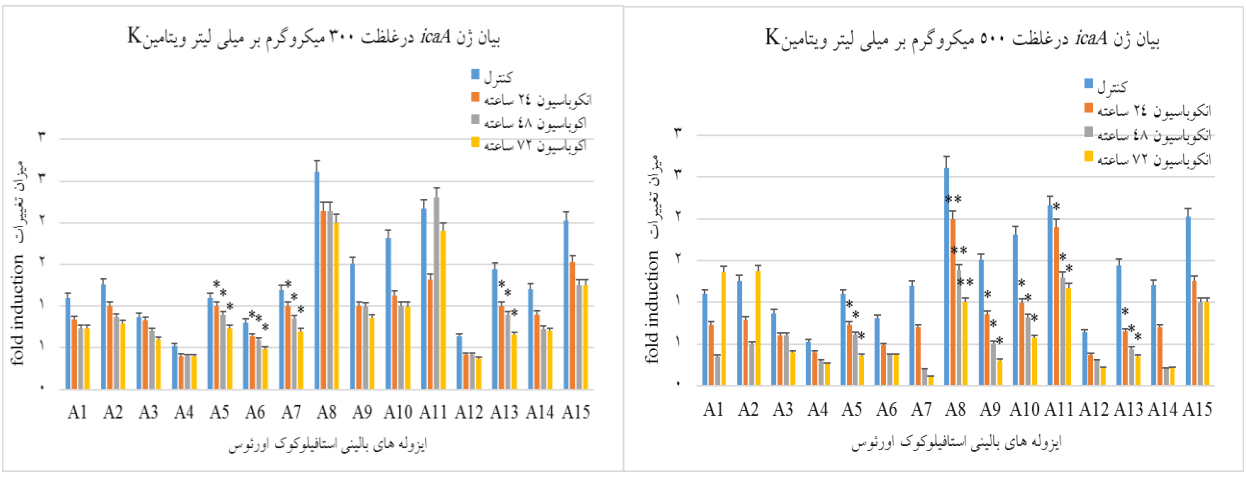
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]



شکل ۱. منحنی های حاصل از تکثیر موفقیت آمیز ژن های *icaA* (سمت راست) و *icaR* (سمت چپ)در ایزوله های مختلف *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی سیلین. مقدار ترشولدر برای تمامی مراحل ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شده است.



شکل ۲. میزان بیان ژن *icaR* در باکتری *استافیلوکوک اورئوس* تیمار شده با ویتامین K در غلظت های ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر . نتایج بر اساس MEAN ± SD در مقایسه با کنترل ارائه شده است. $p<0.05$* و $p<0.01$**معنی دار است. ستون های فاقد* $p>0.05$ و بی معنی است.



نشکل ۳. میزان بیان ژن *icaA* در باکتری *استافیلوکوک اورئوس* تیمار شده با ویتامین K در غلظت های ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر . نتایج بر اساس MEAN ± SD در مقایسه با کنترل ارائه شده است. $p<0.05$* و $p<0.01$**معنی دار است. ستون های فاقد* $p>0.05$ و بی معنی است.

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت‌های باکتریایی با منشا استافیلوکوکی یکی از مهم‌ترین عفونت‌هایی می‌باشد که هم به‌صورت منتشره و هم به صورت موضعی ایجاد می‌شود. در این مسیر، برخی از باکتری‌های مورد هدف آنتی‌بیوتیک زنده مانده و در نسل‌های بعدی زمینه مقاومت به آنتی‌بیوتیک مورد استفاده را فراهم می‌کنند تا بتوانند بقا خود را در شرایط نامناسب حفظ کنند

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[۱۷]. از این‌رو، استفاده از برخی جایگزین‌ها و مکمل‌های داروئی می‌تواند در کنترل برخی از سویه‌های مقاوم موثر باشد. استفاده از عصاره‌های گیاهی، مواد معدنی، برخی مواد موثره از جمله مواردی است که در بسیاری از مطالعات جهت مهار و یا کاهش فعالیت تولید بیوفیلم توسط *استافیلوکوک اورئوس* مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است [۱۸]. نقش موثر و مفیدی در عمل‌کرد آن دارو داشته باشد. حضور بیوفیلم یکی از عواملی است که هم باعث مقاومت آنتی‌بیوتیکی شده و هم باعث بیماری‌زایی می‌شود [۲۰،۱۹]. تولید بیوفیلم ناشی از فعالیت اوپرونی تحت عنوان *icaABCD* می‌باشد که مهم‌ترین عامل برای تشکیل ماتریکس ایزوپلی ساکاریدی و از عوامل چسبندگی بین سلولی PIA است. توسط *icaD* و *icaC*، *icaB*، *icaA* ژن‌های سیستم‌های تنظیمی متعددی کنترل می‌شوند [۲۱]. در این مطالعه بعد از غربالگری سویه‌های مورد مطالعه ۱۵ سویه *استافیلوکوک اورئوس* جهت بررسی کمی مورد نظر قرار گرفت. دلیل اصلی از انتخاب این تعداد سویه، جلوگیری از ورود داده‌های غیرضروری و نامتناسب به داخل مطالعه بود، هم‌چنین این ۱۵ سویه از نظر کیفی دارای خصوصیاتی بودند که اهداف اصلی طرح را فراهم کردند. در این بررسی با اثردهی ویتامین K در غلظت‌های مختلف، مشخص شد که این ویتامین با افزایش غلظت، می‌تواند ژن‌های *icaA* و *icaR* را مهار کند و مقدار بیان آن‌ها را کاهش دهد. این در حالی بود که ژن *icaR* با کاهش بیش‌تری نسبت به ژن *icaA* همراه بود. Jacquelin و همکاران که بر روی تعیین حداقل غلظت مهاری ویتامین K در باکتری‌های مختلف صورت گرفت، مشخص شد که باکتری‌هایی از جمله *استافیلوکوک اورئوس* که دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی هستند و به طیف گسترده‌ای آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت دارند، دارای مقاومت نسبت به عمل‌کرد ویتامین K می‌باشند. این در حالی بود که غلظت‌های استوک جهت تعیین حداقل غلظت مهاری ۱۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شده بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده در مطالعه ذکر شده و نتایج مطالعه حاضر، می‌توان اثر ویتامین K در غلظت‌های بالای ۳۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را منطقی دانست و علت آن را توجیه کرد [۱۳].

تولید بیوفیلم در ایزوله‌های جداسازی شده از نمونه‌های زخم همیشه با قدرت و حدت یکسانی همراه نیستند. برخی از سویه‌های استافیلوکوک اورئوسی که در برابر مواد ضد عفونی و یا عوامل نامساعدتری قرار داشته‌اند، ممکن است شرایط را به نحوی برای خود تغییر داده باشند که توان تولید بیوفیلم آن‌ها با قدرت بیش‌تری همراه شده باشد. این امر را می‌توان در ایزوله‌های A8، A11 و A15 به وضوح دید. در این ایزوله‌ها مقادیر به‌دست آمده از بیان ژن در زمان قبل از تیمار با زمان بعد از تیمار در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با کاهشی ۱۰۰ درصدی همراه بوده است. در حالی که در ایزوله‌هایی که بیان ژن *icaA* در آن‌ها کم‌تر بود، کاهش بیان در حد بسیار کمی مشاهد شد. ژن *icaR* نیز در مواجه با غلظت‌های مختلف ویتامین K دچار تغییرات کاهشی فراوانی شد. این ژن که یک ژن تنظیمی بیوفیلم می‌باشد، می‌تواند با تغییرات خود بر سیکل تولید بیوفیلم اثر بگذارد. با افزایش زمان گرم‌خانه‌گذاری و غلظت ویتامین مورد بررسی، کاهش این ژن با قوت بیش‌تری صورت گرفت. این در حالی بود که ژن *icaA* در گرم‌خانه‌گذاری‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت دارای کاهش بیش‌تری بود. این امر را می‌توان با رشد باکتری در شرایط نامساعد و خارج شدن ژن تنظیمی *icaR* از مدار تولید بیوفیلم همسو دانست. چرا که در صورت بیش‌تر کردن غلظت ویتامین از ۵۰۰ به ۱۰۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر و افزایش زمان گرم‌خانه‌گذاری، ژن *icaA* نیز به شدت تحت تاثیر قرار می‌گرفت [۱۷]. مطالعات Gschwind و همکاران نشان دادند که ویتامین K می‌تواند اثرات بیش‌تری بر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در *استافیلوکوک اورئوس* بگذارد. در این مطالعه که سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین *استافیلوکوک اورئوس* با ویتامین K مواجه داده شده بودند، مشخص شد که این ویتامین می‌تواند سویه‌های مقاوم را با شدت بیش‌تری تحت تاثیر قرار دهد. نتایج این بررسی با مطالعه ما از این نظر هم‌خوانی دارد که، در مطالعه حاضر سویه‌های دارای مقاومت چندگانه مانند A8 که تولید بیوفیلم نیز می‌کردند، به میزان بیش‌تری بیان ژن‌های *icaA* و *icaR* را نشان دادند [۵].

ویتامین K همیشه کاهش‌دهنده میزان بیوفیلم نبوده است و در برخی مطالعات اثر افزایش این ویتامین بر تولید بیوفیلم مشاهده شده است. در مطالعه‌ای که Kirby و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کشور آمریکا انجام دادند مشخص شد که برخی زیر شاخه‌های ویتامین K نیز می‌توانند بر روی بیوفیلم اثرات افزایشی داشته باشد. این در حالی بود که ایزوله‌های *استافیلوکوک اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین که توانایی تولید بیوفیلم را داشتند در آزمون‌های فنوتیپی توسط ویتامین K دچار افزایش تولید بیوفیلم شده بودند. نتایج این مطالعه به صورت کلی با نتایج مطالعه ما همخوانی نداشت [۱۲]. از جمله دلایل این عدم همخوانی شاید بتوان به آزمون‌های مورد استفاده در دو مطالعه دانست. تست‌های فنوتیپی جهت اثر مهاری و یا القایی ویتامین بر تولید بیوفیلم معمولاً با حساسیت بالایی همراه نیستند و ممکن است خطای روش، نتایج را

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

تحت تاثیر قرار دهد. با استفاده از روش‌های دقیق‌تر و حساس‌تر می‌توان این خطاها را پوشش داد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که حضور ویتامین K به عنوان مهارکننده ژن‌های *icaA* و *icaR* می‌تواند برای درمان عفونت‌های پوستی با منشا *استافیلوکوک اورئوس* در کنار برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مورد استفاده قرار گیرد. گرچه بدون انجام آزمون‌های تکمیلی و استفاده از حیوان آزمایشگاهی برای به‌دست آوردن بهترین و بالاترین اثر این ویتامین در کنار آنتی‌بیوتیک‌ها، نمی‌توان با قاطعیت اظهار نظر کرد، ولی می‌توان این احتمال را قوی دانست که با مهار شدن این ژن‌های عامل تولید بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی، بتوان با استفاده از غلظت‌های بالاتر اثرپذیری سویه‌های تولیدکننده بیوفیلم را افزایش داد. از طرفی به دلیل مهار سویه‌های *استافیلوکوک اورئوس* جدا شده از زخم و نتایج اثر ویتامین K بر این سویه‌ها، کنترل غلظت در عفونت‌های پوستی ایجاد شده راحت‌تر خواهد بود. با توجه به موارد ذکر شده پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی بر روی موجود زنده و در شرایط شبیه‌سازی شده بدن انسان، به منظور قوی‌تر کردن موضوع اثر ویتامین K بر محدود کردن تولید بیوفیلم پرداخت.

تشکر و قدردانی

این مقاله با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی همدان و دانشگاه آزاد واحد همدان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت‌های محترم ابراز می‌دارند.

منابع

[1] Zarei Koosha R, Mahmoodzadeh Hosseini H, Mehdizadeh Aghdam E, Ghorbani Tajandareh S, Imani Fooladi AA. Distribution of tsst-1 and mecA Genes in Staphylococcus aureus Isolated From Clinical Specimens. Jundishapur J Microbiol 2016; 9: e29057. (Persian).

[2] Abdal N, Ghaznavirad E, Hamidi A, Hosseini D. Prevalence of genes encoding aminoglycoside resistant in methicillin-sensitive Staphylococcus aurous and coagulase-negative staphylococci isolated from hospital infectious. Koomesh 2014; 16: 82-89. (Persian).

[3] Heydari N, Alikhani MY, Azizi Jalilian F, Tahmasebi H, Arabestani MR. Evaluation of real time PCR for detection of clinical isolates of Staphylococcus aureus and methicillin-resistance strains based on melting curve analysis method. Koomesh 2017; 19: 877-886. (Persian).

[4] Tahmasebi H, Zeiyni B, Dehbashi S, Motamedi H, Vafaeifar M, Keramat F, Arabestani MR. The study of blaZ and mecA gene expression in methicillin-resistant staphylococcus aureus strains and the relationship between the gene expression Patterns. 2017; 2017: 6. (Persian).

[5] Gschwind L, Rollason V, Daali Y, Bonnabry P, Dayer P, Desmeules JA. Role of P-glycoprotein in the uptake/efflux transport of oral vitamin K antagonists and rivaroxaban through the Caco-2 cell model. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2013; 113: 259-265.

[6] Hammond RK, White DC. Inhibition of vitamin K2 and carotenoid synthesis in Staphylococcus aureus by diphenylamine. J Bacteriol 1970; 103: 611-615.

[7] Gewin HM, Friou GJ. Manifestations of vitamin deficiency during aureomycin and chloramphenicol therapy of endocarditis due to Staphylococcus aureus; report of a case. Yale J Biol Med 1951; 23: 332-338.

[8] Chen X, Shang F, Meng Y, Li L, Cui Y, Zhang M, Qi K, Xue T. Ethanol extract of Sanguisorba officinalis L. inhibits biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an ica-dependent manner. J Dairy Sci 2015; 98: 8486-8491.

[9] Zhu Y, Weiss EC, Otto M, Fey PD, Smeltzer MS, Somerville GA. Staphylococcus aureus biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. Infect Immun 2007; 75: 4219-4226.

[10] Ferreira FA, Souza RR, Bonelli RR, Americo MA, Fracalanzza SE, Figueiredo AM. Comparison of in vitro and in vivo systems to study ica-independent Staphylococcus aureus biofilms. J Microbiol Methods 2012; 88: 393-398.

[11] Szweda P, Schielmann M, Milewski S, Frankowska A, Jakubczak A. Biofilm production and presence of ica and bap genes in Staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis in the eastern Poland. Pol J Microbiol 2012; 61: 65-69.

[12] Kirby DT, Savage JM, Plotkin BJ. Menaquinone (Vitamin K2) Enhancement of Staphylococcus aureus Biofilm Formation. J Bios Med 2014; 12: 26-32.

[13] Andrade JC, Morais Braga MF, Guedes GM, Tintino SR, Freitas MA, Quintans LJ, et al. Menadione (vitamin K) enhances the antibiotic activity of drugs by cell membrane permeabilization mechanism. Saudi J Biol Sci 2017; 24: 59-64.

[14] DW sJaR. Molecular cloninig:a laboratory manual. 3 ed: cold spring harbor laboratory press; 2001.

[15] Ares M. Bacterial RNA isolation. Cold Spring Harb Protoc 2012; 2012: 1024-1027.

[16] Pfaffl WM. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29: e45.

[17] Schlievert PM, Merriman JA, Salgado-Pabón W, Mueller EA, Spaulding AR, Vu BG, et al. Menaquinone Analogs Inhibit Growth of Bacterial Pathogens. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57: 5432-5437.

[18] Mirzaie A, Noorbazargan H, Khatami SHRK, Sadat Shandiz SA, Rahimi A, Bagheri keshtali Aa. Evaluation of chemical composition of helichrysum artemisioides extract its effect on biofilm formation and IcaD gene expression in clinical Isolates of methicillin-resistant staphylococcus aureus. J Ilam Univ Med Sci 2017; 25: 180-194. (Persian).

[19] Lee KM, Go J, Yoon MY, Park Y, Kim SC, Yong DE, Yoon SS. Vitamin B12-mediated restoration of defective anaerobic growth leads to reduced biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun 2012; 80: 1639-1649.

[20] Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg EP. Quorum sensing in Staphylococcus aureus biofilms. J Bacteriol 2004; 186: 1838-1850.

[21] Osman KM, Amer AM, Badr JM, Helmy NM, Elhelw RA, Orabi A, et al. Antimicrobial resistance, biofilm formation and mecA characterization of methicillin-susceptible S. aureus and Non-S. aureus of beef meat origin in egypt. Front Microbiol 2016; 7: 222.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Activity of biofilm genes *icaA* and *icaR* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with vitamin K in wound specimens

Naime Kashefi pasandideh (M.Sc)[1], Mohammad Reza Habibi (Ph.D) [1], Hamed Tahmasebi (M.Sc)[2], Mohammad Reza Arabestani (Ph.D)[*3,4]

1 - Department of Microbiology,Hamadan University of Basic Azad University, Hamadan, Iran
2 - Department of Microbiology,Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran
3 - Department of Microbiology,Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
4- Brucellosis Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

* Corresponding author. +98 8123838077 mohammad.arabestani@gmail.com
Received: 18 Sep 2017; Accepted: 6 Feb 2018

Introduction*:* The use of vitamin K plays a very important role in human health. This vitamin may have effects on some of the pathogens such as biofilms in *Staphylococcus aureus*.In this account, the purpose of this study was to determine the effect of vitamin K on the expression of icaA and icaR genes in methicillin-resistant *S. aureus* isolated from the wound sample.

Materials and Methods*:* In this interventional study, 15 isolates of methicillin-resistant *S. aureus* were treated with vitamin K at concentrations of 1, 10, 50, 100, 200, 300 and 500 µg / ml. Time intervals for incubation were determined 24, 48 and 72 hours. Finally, the desired RNA was extracted and cDNA was synthesized. The expressions of *icaA* and *icaR* genes were evaluated using qPCR method.

Results: The expression levels of icaA and icaR genes were used as controls prior to vitamin treatment. Both of genes showed a reduced expression rate in isolates which treated by vitamin K. This effect on the expression of icaA and icaR was clearly observed at a concentration of 200 µg and also in the 48-hour incubation.

Conclusion: Vitamin K along with some antibiotics could be effective against some certain skin infections which caused by methicillin resistance S. *aureus.*

Keywords*:* Gene expression, Biofilm, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Vitamin K.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]